



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 258**

51 Int. Cl.:  
**C07J 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07804526 .7**

96 Fecha de presentación : **13.09.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2069382**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.06.2009**

54 Título: **Proceso para el aislamiento selectivo, purificación y separación de compuestos 3,17-dicetoesteroides monohidroxilados.**

30 Prioridad: **15.09.2006 HU 0600727**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.07.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.07.2011**

73 Titular/es: **RICHTER GEDEON NYRT.**  
**Gyömrői Út 19-21**  
**1103 Budapest, HU**

72 Inventor/es: **Jaksa, István;**  
**Németh, Sándor;**  
**Könczöl, Kálmán;**  
**Terdy, László;**  
**Kozma, István y**  
**Barta, Ferenc**

74 Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

ES 2 363 258 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Proceso para el aislamiento selectivo, purificación y separación de compuestos 3,17-dicetoesteroides monohidroxilados.

5 La invención se refiere a un proceso para el aislamiento selectivo, la purificación y la separación de compuestos 3,17-dicetoesteroides monohidroxilados a partir de una solución obtenida preferentemente por vía microbiológica que contiene una mezcla de compuestos esteroides mediante extracción selectiva, purificación y cristalización selectiva de los compuestos esteroides.

10 Los compuestos 3,17-dicetoesteroides monohidroxilados, por ejemplo 13 $\beta$ -metil-11 $\alpha$ -hidroxi-4-goneno-3,17-diona, 13 $\beta$ -etil-15 $\alpha$ -hidroxi-4-goneno-3,17-diona, 15 $\alpha$ -hidroxi-4-androsteno-3,17-diona y 9 $\alpha$ -hidroxi-4-androsteno-3,17-diona, así como 6 $\xi$ -hidroximetil-1,4-androstadieno-3,17-diona (que es una mezcla de estereoisómeros 6 $\alpha$  y 6 $\beta$ ) son intermedios clave valiosos en la síntesis química de ingredientes activos tales como desogestrel, gestodeno, drospirona, así como hidrocortisona, prednisolona y exemestano.

15 En los procesos industriales, la hidroxilación microbiológica es una práctica de probada eficacia, ya que en muchos casos sólo un microorganismo especial es capaz de hidroxilar una determinada molécula en la posición deseada. En la mayoría de los casos, la síntesis química (si se puede realizar) para resolver este problema es muy complicada, cara, los rendimientos son bajos y se generan numerosos subproductos. En la práctica de la industria farmacéutica, la hidroxilación microbiológica se lleva a cabo de la siguiente manera: en primer lugar se selecciona un microorganismo que es capaz de hidroxilar determinada molécula en la posición deseada mediante screening (cribado), luego se determinan aquellos parámetros óptimos (componentes del nutriente, pH, temperatura, oxígeno disuelto, etc.) que se deben mantener para llevar a cabo la bioconversión a un buen nivel de bioconversión.

20 Al final del complicado procedimiento mencionado anteriormente, se obtiene un gran volumen de caldo de fermentación y el producto deseado, en nuestro caso el compuesto esteroide monohidroxilado, debe ser aislado de esta solución. El caldo de fermentación es heterogéneo desde el punto de vista tanto físico como químico, contiene células microbianas, así como componentes celulares que se liberan de las células microbianas, el sustrato residual, componentes residuales del nutriente, productos del metabolismo, el producto u subproductos formados, agentes antiespumantes, detergentes, etc. La concentración del producto en el caldo de fermentación se encuentra normalmente entre 1 y 10 g/dm<sup>3</sup>, por tanto, el caldo de fermentación es una "solución diluida" que contiene gran cantidad de impurezas y, naturalmente, el producto deseado en la más alta concentración.

30 Como se puede observar, el procesamiento posterior de los caldos de fermentación - aislamiento del producto deseado - es un procedimiento muy complicado. El producto deseado y los componentes residuales del nutriente, los productos del metabolismo del microorganismo, los aditivos (agentes antiespumantes, detergentes), el sustrato residual, los subproductos formados y otras impurezas deben ser separados. La situación se complica todavía más, ya que normalmente la solubilidad de los compuestos esteroides en agua es muy baja, con lo que el producto formado está parcialmente en solución, parcialmente precipitado en la superficie de la biomasa. En caso de utilizar una concentración más alta de sustrato, se debe aislar el producto deseado desde dos lugares diferentes: el filtrado del caldo de fermentación y la superficie de la biomasa.

40 Se han realizado diversos intentos para resolver los problemas mencionados anteriormente. Por ejemplo, según la patente japonesa 54-105294, con el fin de separar mezclas de esteroides, los grupos hidroxilo de los compuestos esteroides son acilados, luego purificados mediante cromatografía en columna utilizando silicagel u óxido de aluminio y finalmente una cristalización fraccionada produce el producto deseado. La publicación no contiene datos cuantitativos referentes a la eficacia del procedimiento, pero el procesamiento posterior de una acilación a escala industrial - utilizando piridina como disolvente - puede causar muchos problemas. En este procedimiento en varias etapas, la pérdida operacional del producto es forzosamente alta y, por tanto, la aplicación del procedimiento no es económica.

45 La Especificación de Patente EP 245985 describe el aislamiento de compuestos biológicamente activos a escala de laboratorio. Según el procedimiento, la solución tamponada de los compuestos biológicamente activos solubles en agua se extrae con un disolvente especial apropiado inmiscible en agua (por ejemplo polietilenglicol), en presencia de un adsorbente microgranulado (0,01-10  $\mu$ m) que contiene un grupo funcional. El producto se une de forma reversible al adsorbente del que, después de llevar a cabo los procesos de separación de fases, puede ser recuperado mediante métodos conocidos. La puesta en práctica industrial de este proceso es muy dudosa.

50 La Especificación de Patente Húngara 192.668 describe la síntesis microbiológica de 15 $\alpha$ -hidroxi-4-androsteno-3,17-diona. Durante el proceso, la bioconversión se lleva a cabo mediante hongos *Penicillium melinii* o *Fusarium oxysporum f. vasinfectum*. La especificación describe brevemente también el método de aislamiento de compuestos esteroides, según el cual el caldo de fermentación se extrae tres veces con isobutil metil cetona (extracción total), se concentran los extractos combinados en un evaporador de película y se evaporan hasta sequedad en un evaporador rotativo utilizando un baño de agua. Se lava el residuo con hexano con el fin de eliminar el agente antiespumante y finalmente cristalizan los compuestos esteroides a partir de isobutil metil cetona. El inconveniente de este proceso es que produce sólo cristales crudos. La descripción no da ninguna instrucción sobre

la purificación posterior del producto y la separación de los subproductos esteroides formados ni sobre el sustrato residual.

Según el proceso publicado en la Especificación de Patente Húngara 217.624, los esteroides hidroxilados se aíslan del filtrado de baja concentración ( $1 \text{ g/dm}^3$ ) del caldo de fermentación utilizando resinas de adsorción macrorreticulares y elución en gradiente. La relación entre el adsorbato y el adsorbente es 1:20, es decir que se necesitan 20 g de resina para unir 1 g de esteroide. El límite del proceso es que, en caso de una concentración más alta ( $6\text{-}10 \text{ g/dm}^3$ ) de sustrato, a escala industrial ( $20\text{-}50 \text{ m}^3$ ), se debe utilizar una gran cantidad de adsorbente, por consiguiente tanto el embalaje como el equipo serían caros y el proceso no resultaría económico.

La patente de Estados Unidos 4.036.695 describe un proceso para la preparación de compuestos de estreno-3,17-diona mediante la fermentación de una 18-alkil-4-estreno-3,17-diona con un cultivo fúngico del género *Penicillium* o *Fusarium*. Cuando la conversión ha finalizado, se separa por filtración el hongo micelio y el caldo de cultivo se extrae con metil isobutil cetona. Se combinan las soluciones de extractos orgánicos y se evaporan. El residuo cristalino marrón se purifica y recristaliza para obtener el derivado puro de 15 $\alpha$ -hidroxi-18-metil-4-estreno-3,17-diona.

Tal como se ha mencionado anteriormente, distintos compuestos esteroides hidroxilados, por ejemplo 13 $\beta$ -etil-11 $\alpha$ -hidroxi-4-goneno-3,17-diona, 13 $\beta$ -etil-15 $\alpha$ -hidroxi-4-goneno-3,17-diona, 15 $\alpha$ -hidroxi-4-androsteno-3,17-diona y 9 $\alpha$ -hidroxi-4-androsteno-3,17-diona, así como 6 $\xi$ -hidroximetil-1,4-androstadieno-3,17-diona - nuestros compuestos diana - son intermedios clave valiosos en la síntesis química de ingredientes activos tales como desogestrel, gestodeno, drospirenona, así como hidrocortisona, prednisolona y exemestano. Las síntesis químicas son complicadas, son procesos en varias etapas, por tanto la pérdida operacional del producto es forzosamente alta en su práctica a escala industrial. Normalmente se necesitan 8-10 kg del intermedio clave para la síntesis de 1 kg de ingrediente activo. De acuerdo con estos hechos, la síntesis de compuestos esteroides hidroxilados debería llevarse a cabo a gran escala (ocasionalmente varios kg/lote).

La hidroxilación microbiológica de compuestos esteroides puede llevarse a cabo normalmente mediante bioconversión al 60-90%. El problema más importante durante el aislamiento del producto es la separación del sustrato residual y del subproducto formado, ya que en las siguientes etapas de síntesis del intermedio activo sólo se pueden utilizar aquellos productos cuyo contenido de sustrato sea inferior a un límite determinado. Este límite depende del producto, encontrándose normalmente entre el 1 y el 2,5%.

El proceso mencionado anteriormente puede realizarse a escala de laboratorio y piloto utilizando gel de sílice o resinas de adsorción macrorreticulares en la separación cromatográfica. En el caso de una cantidad de varios cientos de kilogramos de sustancia, no se puede utilizar ninguno de estos pasos, ya que la cantidad de carga cromatográfica y de disolventes necesarios para este proceso sería muy grande, el proceso no sería económico a escala industrial.

Nuestro objetivo consistía en desarrollar un proceso económico, industrialmente aplicable, que eliminara los inconvenientes de los procesos conocidos y permitiera el aislamiento de una gran cantidad del producto deseado con una alta pureza y un buen rendimiento.

Durante nuestros experimentos, se tenía que tener en cuenta que nuestros compuestos deseados, los compuestos esteroides hidroxilados mencionados anteriormente, tienen propiedades químicas, físicas y físico-químicas muy similares, también sus polaridades son apenas ligeramente diferentes. Esto significa que todos estos compuestos se comportan de forma muy similar durante determinada manipulación (por ejemplo disolución, extracción, precipitación).

Durante nuestros experimentos, descubrimos que el producto formado en el proceso de fermentación, el sustrato residual y los subproductos - según su solubilidad - pueden encontrarse disueltos en el caldo de fermentación y precipitados en la superficie de la biomasa. Excepto cuando la concentración del sustrato añadido es inferior a  $1,5 \text{ g/dm}^3$ , en cuyo caso el producto permanece en solución. En consecuencia, los compuestos esteroides deben ser aislados tanto de la solución como de la fase sólida.

Se descubrió que era práctico eliminar por filtración la biomasa del caldo de fermentación, pudiéndose entonces aislar los compuestos esteroides del filtrado con un disolvente orgánico inmiscible o parcialmente inmiscible en agua (un éster alifático o una cetona alifática). Se descubrió asimismo que las impurezas de tipo esteroide de origen biológico podían eliminarse selectivamente mediante el tratamiento de la fase orgánica con una solución acuosa de carácter básico de fuerza iónica apropiada, pudiéndose luego obtener el producto crudo conteniendo los compuestos esteroides, después de añadir agua, mediante evaporación del disolvente. Los compuestos esteroides se disuelven de la biomasa filtrada con alcoholes o cetonas alifáticas miscibles en agua utilizando una extracción sólido-líquido y, después de la evaporación del disolvente, se obtiene el producto cristalino crudo.

Los productos cristalinos crudos obtenidos desde ambos lugares se mezclan, se disuelven en un alcohol o una cetona alifática en agua y la solución se trata con carbón vegetal y/o perfil. Se filtra el floculante y se evapora el disolvente para producir cristales homogéneos crudos. Los cristales homogéneos crudos así obtenidos contienen el

producto, del 8 al 25% de sustrato residual, dependiendo de la bioconversión, así como cierto porcentaje de otros esteroides. Estos compuestos deben ser separados también - tal como se ha mencionado anteriormente - preferentemente no por cromatografía.

5 Los métodos de cristalización habituales aplicados en la práctica industrial (por ejemplo cristalización a partir de disolvente, de agua o precipitación con agua) no tuvieron éxito, ya que la eliminación de una unidad de sustrato provocó la pérdida de 2 a 4 unidades de producto, es decir que la solubilidad del producto era mejor en estas mezclas que la solubilidad de la principal impureza, el sustrato.

10 Durante nuestros experimentos se descubrió sorprendentemente que, cuando los cristales homogéneos crudos se disolvían en un hidrocarburo clorado y el producto precipitaba mediante la adición de un hidrocarburo alifático o aromático, cambiaba el coeficiente de solubilidad. En este sistema, la solubilidad del componente apolar (el sustrato) es de 10 a 60 veces mejor que la solubilidad del compuesto polar (el producto), dependiendo de la cantidad de sustrato. En consecuencia, se puede eliminar la impureza más apolar mediante esta cristalización selectiva sin perder grandes cantidades de producto (la pérdida de producto es inferior al 1%). Es razonable disolver el material cristalino crudo en un hidrocarburo clorado y precipitar el producto con un hidrocarburo alifático o  
15 aromático. En este caso, se puede encontrar la mayor parte del sustrato en el licor madre. Si la bioconversión es baja (20 a 30% de sustrato residual), se puede alcanzar la calidad deseada mediante la repetición del proceso anterior.

20 De acuerdo con los hechos mencionados anteriormente, la presente invención se refiere a un proceso para el aislamiento selectivo, purificación y separación de compuestos 3,17-dicetoesteroides monohidroxilados a partir de una solución obtenida mediante hidroxilación microbiológica que contiene una mezcla de compuestos esteroides mediante la extracción selectiva, purificación y cristalización selectiva de los compuestos esteroides, proceso que se compone de las siguientes etapas:

- 25 a) eliminación de la biomasa del caldo de fermentación, en caso dado después de tratamiento con ácido fosfórico, mediante filtración o centrifugación, aislamiento de los compuestos esteroides del filtrado con una cetona o con un éster alifático de un alcohol alifático, eliminación selectiva de las impurezas de tipo no esteroide de la fase orgánica mediante tratamiento con una solución acuosa de carácter básico y obtención del producto cristalino crudo que contiene los esteroides hidroxilados mediante adición de agua y evaporación del disolvente, y
- 30 b) disolución de los compuestos esteroides de la superficie de la biomasa filtrada obtenida en la etapa a) mediante tratamiento con cetonas o alcoholes alifáticos de 1 a 4 carbonos o una solución acuosa de los mismos y obtención del producto cristalino crudo que contiene los esteroides hidroxilados después de evaporación del disolvente, entonces
- 35 c) disolución del producto obtenido en la etapa a), o en caso dado de la mezcla de los dos productos crudos obtenidos en las etapas a) y b), en una cetona o un alcohol alifático de 1 a 4 carbonos miscible en agua o en una solución acuosa de los mismos, decoloración de la solución y aislamiento de los cristales homogéneos crudos purificados después de evaporación del disolvente, y
- d) recristalización de los cristales homogéneos crudos purificados obtenidos en la etapa c) a partir de una mezcla hidrocarburo clorado/hidrocarburo alifático o cicloalifático y aislamiento del producto puro.

40 De acuerdo con la presente invención, los ésteres alifáticos de la etapa a) son preferentemente acetato de etilo, acetato de n-propilo y las cetonas alifáticas son preferentemente isobutil metil cetona.

La basicidad y la fuerza iónica de la solución acuosa utilizada para eliminar las impurezas no esteroides se ajustan mediante la adición de una cantidad apropiada de hidróxidos de metales alcalinos o alcalinotérreos y/o sales básicas de los mismos, tales como carbonatos, bicarbonatos, hidrogenofosfatos, acetatos y similares.

45 De acuerdo con la presente invención, un disolvente orgánico miscible en agua puede ser preferentemente un alcohol alifático de 1 a 3 carbonos, tal como metanol, etanol, y las cetonas alifáticas tales como acetona y similares.

50 En la etapa de cristalización selectiva, el disolvente orgánico inmisible en agua puede ser preferentemente un hidrocarburo clorado tal como diclorometano, dicloroetano y similares, y los hidrocarburos alifáticos o aromáticos pueden utilizarse como disolventes de precipitación, por ejemplo n-hexano, n-octano, i-octano, i-dodecano, ciclohexano, metilciclohexano y similares.

El proceso de acuerdo con la presente invención puede ser utilizado durante el aislamiento de 13 $\beta$ -etil-11 $\alpha$ -hidroxi-4-goneno-3,17-diona, 13 $\beta$ -etil-15 $\alpha$ -hidroxi-4-goneno-3,17-diona, 15 $\alpha$ -hidroxi-4-androsteno-3,17-diona y 9 $\alpha$ -hidroxi-4-androsteno-3,17-diona, así como 6 $\xi$ -hidroximetil-1,4-androstadieno-3,17-diona.

Las ventajas del proceso de la presente invención son las siguientes:

- 55
- su puesta en práctica no requiere una alta inversión,

- método de separación de bajo coste, eficaz,
  - proporciona una alta selectividad,
  - la pérdida de producto es muy baja,
  - el proceso es rápido, reproducible y fácilmente realizable,
- 5 • la cantidad de disolventes aplicados es baja, por ejemplo se pueden cristalizar selectivamente 450 a 500 kg de producto crudo a partir de 6 m<sup>3</sup> de disolvente.

Se ilustra la presente invención por medio de los siguientes ejemplos no limitativos.

**Ejemplo 1: Aislamiento de 15 $\alpha$ -hidroxi-4-androsteno-3,17-diona**

10 La bioconversión se lleva a cabo por un método conocido, por ejemplo de acuerdo con la Especificación de Patente Húngara 192.668 mediante el hongo *Penicillium melinii*, en 900 dm<sup>3</sup> de volumen útil. La cantidad de sustrato 4-androsteno-3,17-diona añadido es de 9 g/dm<sup>3</sup>, la bioconversión es del 75%. A la finalización de la bioconversión, se analiza el caldo de fermentación y se ajusta el pH del caldo de fermentación a 3,5-4,0 mediante adición de ácido fosfórico al 10% con el fin de incrementar la eficacia de filtración, se añaden 9 kg de perfil como auxiliar de filtración. La temperatura del caldo de fermentación se incrementa a 100°C para destruir los microorganismos. Luego se enfría la temperatura de la mezcla a 40-45°C y se filtra la biomasa con una centrifugadora de tipo C-10 provista de lona técnica.

El peso de la biomasa filtrada es de 36 kg.

20 La temperatura del filtrado se baja a 20-25°C y se extrae la mezcla con 500 dm<sup>3</sup> de acetato de n-propilo en un aparato provisto de agitador. Después de separar las fases, se extrae repetidas veces la fase acuosa con 250 dm<sup>3</sup> de acetato de n-propilo. La extracción es seguida de técnicas TLC y HPLC. Las fases orgánicas que contienen los compuestos esteroideos se combinan y concentran hasta un volumen de aproximadamente 200 dm<sup>3</sup> en un duplicador. La fase orgánica de volumen reducido se extrae dos veces con 100 dm<sup>3</sup> de una disolución de hidróxido sódico al 5% para eliminar las impurezas no esteroideos. Se desechan las fases acuosas después de la neutralización. Se añaden 40 dm<sup>3</sup> de agua a la fase orgánica y la mezcla se traslada a un aparato que puede calentar o enfriar y está provisto de agitador y se evapora el disolvente orgánico. Se filtran y secan los cristales crudos así obtenidos (que contienen el producto esteroide).

30 Se traslada la biomasa a un aparato que puede calentar o enfriar y está provisto de agitador y se añaden 400 dm<sup>3</sup> de etanol acuoso al 60% en peso. Se agita la mezcla durante 30 minutos y se filtra la biomasa mediante una centrifugadora de tipo C-10. Luego se extrae repetidas veces la biomasa con 300 dm<sup>3</sup> de etanol acuoso al 60% en peso y se separa por centrifugación. Se incinera la biomasa filtrada. Se combinan los dos filtrados y se separa por destilación el etanol en un duplicador. Se enfría el residuo a 20°C y los esteroideos precipitados que contienen el segundo producto crudo se filtran y secan.

35 Los dos productos cristalinos crudos obtenidos mediante los procesos anteriores se trasladan a un aparato provisto de agitador y se disuelven en una mezcla de 36 dm<sup>3</sup> de acetona y 4 dm<sup>3</sup> de agua a 45-50°C. Luego se añade 1 kg de Norit y 1 kg de perfil y la mezcla se agita durante 30 minutos, después se filtra el floculante y se lava con una mezcla de 1 dm<sup>3</sup> de acetona y 3 dm<sup>3</sup> de agua. Se combinan el filtrado y el lavado y se concentra a medio volumen en un duplicador. Se enfría el residuo a 10°C, se filtran y secan los cristales crudos purificados precipitados.

El peso de los cristales así obtenidos es de 6,4 kg y, según HPLC, la composición de los mismos es la siguiente:

40	15 $\alpha$ -hidroxi-4-androsteno-3,17-diona	85,0%
	4-androsteno-3,17-diona	10,9%
	otros esteroideos	1,9%

45 Con el fin de separar el producto y el sustrato, se añaden al producto anterior 64 dm<sup>3</sup> de metilciclohexano y se elimina el agua de la mezcla mediante destilación azeotrópica. Luego se añaden 25,6 dm<sup>3</sup> (el volumen es cuatro veces el peso de los cristales) de diclorometano a la mezcla para obtener una solución transparente, que se clarifica con 2 kg de óxido de aluminio. Se concentra la solución clarificada bajo presión atmosférica hasta un volumen de 70 dm<sup>3</sup> y se enfría a 25°C. Se filtran y secan los cristales precipitados.

El peso de la 15 $\alpha$ -hidroxi-4-androsteno-3,17-diona cristalina así obtenida es de 5,6 kg y, según HPLC, su composición es la siguiente (el rendimiento es del 89% calculado sobre el caldo de fermentación):

50	15 $\alpha$ -hidroxi-4-androsteno-3,17-diona	96,2%
	4-androsteno-3,17-diona	1,4%

otros esteroides 1,4%

(Cuando se repite la última etapa de cristalización, en ciertos casos se puede reducir más la cantidad de impurezas del sustrato.)

**Ejemplo 2: Aislamiento de 13β-etil-15α-hidroxi-4-goneno-3,17-diona**

5 La bioconversión se lleva a cabo por un método conocido, por ejemplo de acuerdo con la Patente Húngara 221.745 mediante el hongo *Fusarium equiseti*, en 20 m<sup>3</sup> de volumen útil. La cantidad de sustrato 13β-etil-4-goneno-3,17-diona añadido es de 1,5 g/dm<sup>3</sup>, la bioconversión es del 77%. A la finalización de la bioconversión, se analiza el caldo de fermentación y se encuentra en la solución una mayor cantidad de compuestos esteroides, la precipitación en la superficie de la biomasa es sólo mínima.

10 Se filtra el caldo de fermentación de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1, a diferencia de que en lugar de centrifugar se utiliza un filtro prensa de 30 m<sup>2</sup> de superficie filtrante útil. El peso de la biomasa húmeda filtrada es de 500 kg (se incinera debido a su bajo contenido en esteroides).

15 El filtrado del caldo de fermentación se extrae con 4 m<sup>3</sup> de acetato de etilo en un separador de tipo CINC con el método de operación de flujo a contracorriente. Se desecha el refinado y la fase orgánica se concentra hasta un volumen de 2 m<sup>3</sup>. La fase orgánica de volumen reducido se extrae dos veces con 1 m<sup>3</sup> de una disolución de hidróxido sódico al 5% con el fin de eliminar las impurezas no esteroides. Las fases acuosas se desechan después de neutralización. Se añaden 600 dm<sup>3</sup> de agua a la fase orgánica y la mezcla se traslada a un aparato que puede calentar o enfriar y está provisto de agitador y se evapora el disolvente orgánico. Se filtran y secan los cristales crudos que contienen esteroides así obtenidos.

20 Se traslada el producto crudo a un aparato provisto de agitador y se disuelve en una mezcla de 180 dm<sup>3</sup> de acetona y 360 dm<sup>3</sup> de agua a 45-50°C. A continuación, se añaden 4 kg de carbón vegetal Norit y 4 kg de perfil y se agita la mezcla durante 30 minutos, luego se filtran y lavan los floculantes con una mezcla de 20 dm<sup>3</sup> de acetona y 60 dm<sup>3</sup> de agua. Se combinan el filtrado y el lavado y se evapora el disolvente orgánico en un duplicador. Se enfría el residuo a 10°C, se filtran y secan los cristales crudos purificados precipitados.

25 El peso de los cristales así obtenidos es de 21,5 kg y, según HPLC, la composición de los mismos es la siguiente:

13β-etil-15α-hidroxi-4-goneno-3,17-diona	94,6%
13β-etil-4-goneno-3,17-diona	3,3%
otros esteroides	2,6%

30 Con el fin de separar el producto y el sustrato, se disuelve el producto crudo anterior en 54 dm<sup>3</sup> (el volumen es dos veces y medio el peso de los cristales) de diclorometano y se añaden 270 dm<sup>3</sup> de metilciclohexano con agitación lenta desde un depósito durante un período de tiempo de aproximadamente 1 hora. Se filtran y secan los cristales precipitados.

35 El peso de la 13β-etil-15α-hidroxi-4-goneno-3,17-diona así obtenida es de 20,8 kg y, según HPLC, la composición de la misma es la siguiente (el rendimiento es del 87% calculado sobre el caldo de fermentación):

13β-etil-15α-hidroxi-4-goneno-3,17-diona	96,7%
13β-etil-4-goneno-3,17-diona	0,5%
otros esteroides	1,9%

**Ejemplo 3: Aislamiento de 13β-etil-11α-hidroxi-4-goneno-3,17-diona**

40 La bioconversión se lleva a cabo por un método conocido, por ejemplo de acuerdo con la Patente Húngara 216.874 mediante el hongo *Cylindrocarpon dydimum*, en 5 dm<sup>3</sup> de volumen útil. La cantidad de sustrato 13β-etil-4-goneno-3,17-diona añadido es de 4 g/dm<sup>3</sup>, la bioconversión es del 87%. A la finalización de la bioconversión, se analiza el caldo de fermentación y se encuentran compuestos esteroides tanto en el caldo de fermentación como en la superficie de la biomasa filtrada. Se ajusta el pH del caldo de fermentación a 3,5-4,0 por adición de ácido fosfórico al 10% con el fin de incrementar la eficacia de la filtración, se añaden 50 g de perfil como auxiliar de filtración y la temperatura del caldo de fermentación se incrementa a 100°C para destruir los microorganismos. Luego se baja la temperatura de la mezcla a 40-45°C y se filtra la biomasa a través de un filtro de cerámica provisto de lona técnica.

50 La temperatura del filtrado se enfría a 20-25°C y se extrae la mezcla con 2 dm<sup>3</sup> de acetato de n-propilo. Después de separar las fases, se extrae repetidas veces la fase acuosa con 1 dm<sup>3</sup> de acetato de n-propilo. Las fases orgánicas que contienen los compuestos esteroides se combinan y concentran bajo presión reducida hasta un volumen de aproximadamente 1 dm<sup>3</sup> en un Rotavapor utilizando un baño de agua a 65°C. La fase orgánica de volumen reducido se extrae dos veces con 0,5 dm<sup>3</sup> de una disolución de carbonato potásico al 10% para eliminar las

impurezas no esteroideas. Se desechan las fases acuosas después de la neutralización. Se añaden 0,2 dm<sup>3</sup> de agua a la fase orgánica y se evapora el disolvente orgánico en un Rotavapor utilizando un baño de agua a 65°C. Se filtran y secan los cristales crudos así obtenidos que contienen esteroideas.

5 Se traslada la biomasa a un aparato provisto de un agitador y se añaden 2 dm<sup>3</sup> de acetona acuosa al 60% en peso. Se agita la mezcla durante 30 minutos y se filtra la biomasa con un filtro compresor. Se traslada el filtrado a un Rotavapor y se separa por destilación el disolvente. Se enfría el residuo a 20°C y los esteroideas precipitados que contienen el segundo producto crudo se filtran y secan.

10 Los dos productos cristalinos crudos obtenidos mediante los procesos anteriores se trasladan a un aparato provisto de agitador y se disuelven en 0,7 dm<sup>3</sup> de metanol al 70% en peso. Luego se añaden 4 g de Norit y 4 g de perfil y la mezcla se agita durante 30 minutos, después se filtra el floculante a través de un filtro de placas Seitz K5. Se añaden al filtrado 0,5 dm<sup>3</sup> de agua y se elimina por destilación el metanol en un Rotavapor tal como se ha descrito anteriormente. Se enfría el residuo a 20°C, los cristales crudos homogéneos purificados precipitados se filtran a través de un filtro de vidrio PO-3 y se secan.

15 El peso de los cristales así obtenidos es de 18,4 g y, según HPLC, la composición de los mismos es la siguiente:

13β-etil-11α-hidroxi-4-goneno-3,17-diona	82,1%
13β-etil-4-goneno-3,17-diona	8,2%
otros esteroideas	4,1%

20 Con el fin de separar el producto final deseado y el sustrato de partida, se disuelve el producto crudo anterior en 36 cm<sup>3</sup> (el volumen es dos veces y media el peso de los cristales) de diclorometano y se añaden 180 cm<sup>3</sup> de n-hexano con agitación lenta de un depósito durante un período de tiempo de aproximadamente 1 hora. Se filtran y secan los cristales precipitados.

El peso de la 13β-etil-11α-hidroxi-4-goneno-3,17-diona así obtenida es de 15,2 g y, según HPLC, la composición de la misma es la siguiente (el rendimiento es del 83% calculado sobre el caldo de fermentación):

25 13β-etil-11α-hidroxi-4-goneno-3,17-diona	95,2%
13β-etil-4-goneno-3,17-diona	0,8%
otros esteroideas	2,4%

#### **Ejemplo 4: Aislamiento de 9α-hidroxi-4-androsteno-3,17-diona**

30 La bioconversión se lleva a cabo por un método conocido, por ejemplo de acuerdo con la Especificación de Patente de Estados Unidos 4 065 236 mediante la bacteria *Mycobacterium fortuitum*, en 5 dm<sup>3</sup> de volumen útil. La cantidad de sustrato β-sitosterol añadido es de 30 g/dm<sup>3</sup> y según HPLC la concentración de 9α-hidroxi-4-androsteno-3,17-diona en el caldo de fermentación es de 12 g/dm<sup>3</sup> cuando finaliza la bioconversión. A la finalización de la bioconversión, se analiza el caldo de fermentación y se encuentran 1,5 g/dm<sup>3</sup> de producto en el caldo de fermentación y el resto se encuentra en la superficie de la biomasa filtrada. Se elabora el caldo de fermentación filtrado tal como se describe en el Ejemplo 3, excepto que el disolvente utilizado en la extracción es isobutil metil cetona, para producir 6 g de producto cristalino crudo.

Se disuelven los esteroideas de la superficie de la biomasa con 2 dm<sup>3</sup> de metanol al 60% en peso dos veces y se obtiene el segundo producto cristalino crudo (68 g) mediante evaporación del disolvente.

40 Los dos productos cristalinos crudos obtenidos mediante los procesos anteriores se combinan y disuelven en 1,1 dm<sup>3</sup> de metanol al 70% en peso. Luego se añaden 8 g de Norit y 8 g de perfil y la mezcla se agita durante 30 minutos, después se filtran los floculantes. Se añaden al filtrado 0,5 dm<sup>3</sup> de agua y se elimina por destilación el etanol bajo presión reducida. Los cristales crudos homogéneos purificados precipitados se filtran y se secan.

El peso de los cristales así obtenidos es de 65 g y, según HPLC, la composición de los mismos es la siguiente:

45 9α-hidroxi-4-androsteno-3,17-diona	87,2%
otros esteroideas	8,1%

Se disuelve el producto crudo anterior en 0,2 dm<sup>3</sup> de dicloroetano y se añade 1 dm<sup>3</sup> de n-octano con agitación lenta durante un período de tiempo de aproximadamente 1 hora. Se filtran y secan los cristales precipitados.

El peso de la 9 $\alpha$ -hidroxi-4-androsteno-3,17-diona así obtenida es de 58 g y, según HPLC, la composición de la misma es la siguiente (el rendimiento es del 92% calculado sobre el caldo de fermentación):

9 $\alpha$ -hidroxi-4-androsteno-3,17-diona	95,6%
otros esteroides	1,6%

#### 5 Ejemplo 5: Aislamiento de 6 $\xi$ -hidroximetil-1,4-androstadieno-3,17-diona

(una mezcla de los estereoisómeros 6 $\alpha$  y 6 $\beta$ )

La bioconversión se lleva a cabo por un método conocido, por ejemplo de acuerdo con la Solicitud de Patente Húngara N° P07 00584 mediante la bacteria *Arthrobacter simplex*, en 5 dm<sup>3</sup> de volumen útil. La cantidad de sustrato 6 $\xi$ -hidroximetil-4-androsteno-3,17-diona añadido es de 3 g/dm<sup>3</sup> y la bioconversión es del 70%. A la finalización de la bioconversión, se analiza el caldo de fermentación y se encuentra la mayor cantidad de esteroides en la solución, la precipitación en la superficie de la biomasa es sólo mínima. Se añaden 50 g de perfil como auxiliar de filtración al caldo de fermentación y se aumenta la temperatura a 100°C con el fin de destruir el microorganismo. Luego se enfría la temperatura de la mezcla a 30-35°C y se filtra la biomasa a través de un filtro de cerámica provisto de lona técnica.

La temperatura del filtrado se baja a 20-25°C y se extrae la mezcla con 2 dm<sup>3</sup> de acetato de etilo. Después de separar las fases, se extrae repetidas veces la fase acuosa con 1 dm<sup>3</sup> de acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinan y extraen con 1,2 dm<sup>3</sup> de una disolución de hidróxido sódico al 5% para eliminar las impurezas no esteroides. Se desechan las fases acuosas después de la neutralización. Se añaden 0,2 dm<sup>3</sup> de agua a la fase orgánica y se evapora el disolvente orgánico en un Rotavapor utilizando un baño de agua a 65°C. Los cristales crudos así obtenidos que contienen esteroides no son homogéneos, por ello se disuelven en 0,2 dm<sup>3</sup> de metanol y se añaden 0,1 dm<sup>3</sup> de agua y 4 cm<sup>3</sup> de una disolución de hidróxido sódico al 5%. Luego se evapora la fase orgánica para producir cristales crudos homogéneos.

El peso de los cristales así obtenidos es de 8,8 g y, según HPLC, la composición de los mismos es la siguiente:

6 $\beta$ -hidroximetil-1,4-androstadieno-3,17-diona	93,91%
6 $\alpha$ -hidroximetil-1,4-androstadieno-3,17-diona	0,67%
2,6-bis-hidroximetil-1,4-androstadieno-3,17-diona	0,54%
6 $\xi$ -hidroximetil-1,4-androsteno-3,17-diona	0,48%
1,4-androstadieno-3,17-diona	3,56%

Con el fin de obtener el producto con la pureza deseada, se lleva a cabo la eliminación de las impurezas apolares de la siguiente manera: se disuelve el producto crudo anterior en 20 cm<sup>3</sup> de diclorometano y se añaden 100 cm<sup>3</sup> de metilciclohexano con agitación lenta de un embudo de adición durante un período de tiempo de aproximadamente 1 hora. Se filtran y secan los cristales precipitados.

El peso de la 6 $\xi$ -hidroximetil-1,4-androsteno-3,17-diona así obtenida es de 8,32 g y, según HPLC, la composición de la misma es la siguiente (el rendimiento es del 77,6% calculado sobre el caldo de fermentación):

6 $\beta$ -hidroximetil-1,4-androstadieno-3,17-diona	98,10%
6 $\alpha$ -hidroximetil-1,4-androstadieno-3,17-diona	0,43%
2,6-bis-hidroximetil-1,4-androstadieno-3,17-diona	0,49%
6 $\xi$ -hidroximetil-1,4-androsteno-3,17-diona	0,39%
1,4-androstadieno-3,17-diona	0,33%

Observamos que en la siguiente reacción de síntesis de exemestano, los isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  dieron el mismo producto, por tanto no es necesario separarlos.

#### Ejemplo 6: Aislamiento de 15 $\alpha$ -hidroxi-4-androsteno-3,17-diona a escala industrial

La bioconversión se lleva a cabo de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1 en 20 m<sup>3</sup> de volumen útil. A la finalización de la bioconversión, se analiza el caldo de fermentación y se encuentran compuestos esteroides tanto en el caldo de fermentación como en la superficie de la biomasa filtrada. Se ajusta el pH del caldo de fermentación a 3,5-4,0 mediante adición de ácido fosfórico al 10% con el fin de incrementar la eficacia de filtración y la temperatura del caldo de fermentación se incrementa a 100°C para destruir el microorganismo. Luego se enfría la

temperatura de la mezcla a 40-45°C, se añaden 9 kg/m<sup>3</sup> de perfil como auxiliar de filtración y se filtra la biomasa a través de un filtro prensa de tipo Lenser provisto de lona técnica. El peso de la biomasa filtrada es de 700 kg.

5 El filtrado del caldo de fermentación se extrae con 4 m<sup>3</sup> de acetato de n-propilo en un separador de tipo CINC según el método de operación de flujo a contracorriente. Se desecha el refinado después de la neutralización y la fase orgánica se concentra hasta un volumen de aproximadamente 2 m<sup>3</sup>. La fase orgánica de volumen reducido se extrae dos veces con 1 m<sup>3</sup> de una disolución de hidróxido sódico al 1% con el fin de eliminar las impurezas no esteroides. Las fases acuosas se desechan después de la neutralización. Se añaden 1.600 dm<sup>3</sup> de agua a la fase orgánica y la mezcla se traslada a un aparato que puede calentar o enfriar y está provisto de agitador y se evapora el disolvente orgánico. Se enfría el residuo a 20°C y el producto cristalino, crudo, precipitado se filtra mediante una centrifugadora de tipo C-10 provista de lona técnica. Los cristales crudos así obtenidos contienen gran cantidad de impurezas polares, por ello se recrystalizan de la siguiente manera:

15 En un aparato que puede calentar o enfriar y provisto de agitador, se mezclan 1.300 dm<sup>3</sup> de etanol acuoso al 40% en peso con los cristales crudos obtenidos anteriormente. Luego se incrementa la temperatura de la mezcla a 65°C, se añaden 5 kg de carbón vegetal y 3 kg de perfil y la mezcla se agita durante 1 hora a esta temperatura. Se filtran los floculantes a través de un filtro Sparkler y se desechan. Se traslada el filtrado a un duplicador, se añaden 200 dm<sup>3</sup> de agua y se elimina por destilación el etanol bajo presión atmosférica. Se enfría el residuo a 20°C y los cristales purificados precipitados se filtran en una centrifugadora de tipo C-10 provista de lona técnica. El peso de los cristales crudos purificados así obtenidos es de 28 kg.

20 Se traslada la biomasa a un aparato que puede calentar o enfriar y provisto de agitador y se añaden 8 m<sup>3</sup> de etanol acuoso al 60% en peso. Luego se incrementa la temperatura de la mezcla a 60°C, se agita la mezcla durante 60 minutos a esta temperatura y se filtra la biomasa mediante una máquina filtrante de membrana. Se incinera la biomasa filtrada. Se traslada el filtrado a un duplicador y se elimina por destilación el etanol bajo presión atmosférica. Se enfría el residuo a 20°C y se filtran los cristales precipitados mediante una centrifugadora de tipo C-10 provista de lona técnica. El peso de los cristales crudos obtenidos a partir de la biomasa es de 135 kg.

25 Los dos productos cristalinos crudos obtenidos mediante los procesos anteriores se trasladan a un duplicador provisto de agitador y se disuelven en una mezcla de 1.000 dm<sup>3</sup> de acetona y 1.600 dm<sup>3</sup> de agua a 70°C. Luego se añaden 8 kg de carbonato de sodio y la mezcla se somete a reflujo durante 1 hora. Después, se enfría la solución a 55°C, se añaden 10 dm<sup>3</sup> de ácido acético, 10 kg de carbón vegetal y 5 kg de perfil y se agita la mezcla durante 60 minutos, luego se filtran los floculantes a través de un filtro Sparkler. Se traslada el filtrado a un duplicador, se añaden 400 dm<sup>3</sup> de agua y se elimina por destilación la acetona bajo presión atmosférica. Se enfría el residuo a 20°C y los cristales precipitados se filtran mediante una centrifugadora de tipo C-10 provista de lona técnica.

El peso de los cristales homogéneos así obtenidos es de 112 kg y, según HPLC, la composición de los mismos es la siguiente:

35	15α-hidroxi-4-androsteno-3,17-diona	85,0%
	4-androsteno-3,17-diona	12,1%
	otros esteroides	1,8%

40 Con el fin de separar el producto y el sustrato, se añaden 400 dm<sup>3</sup> de metilciclohexano al producto anterior en un duplicador y se elimina el agua de la mezcla mediante destilación azeotrópica. Luego, se filtran los cristales precipitados mediante una centrifugadora de tipo C-10 provista de lona técnica, se trasladan a un aparato provisto de agitador y se disuelven en diclorometano (el volumen es dos veces el peso de los cristales). Después, se añade metilciclohexano (el volumen es ocho veces el peso de los cristales) con agitación lenta. Se filtran y secan los cristales precipitados.

45 El peso de la 15α-hidroxi-4-androsteno-3,17-diona cristalina así obtenida es de 98 kg y, según HPLC, la composición de la misma es la siguiente (el rendimiento es del 70% calculado sobre el caldo de fermentación):

	15α-hidroxi-4-androsteno-3,17-diona	96,2%
	4-androsteno-3,17-diona	1,6%
	otros esteroides	1,2%

50 Cuando se repite la última etapa de cristalización - en caso dado - la cantidad de impureza del sustrato se puede reducir aún más, pero en nuestro caso no es necesario para las siguientes etapas químicas.

**REIVINDICACIONES**

1. Proceso para el aislamiento selectivo, purificación y separación de compuestos 3,17-dicetoesteroides monohidroxilados a partir de una solución obtenida mediante hidroxilación microbiológica que contiene una mezcla de compuestos esteroides a través de la extracción selectiva, purificación y cristalización selectiva de los compuestos esteroides, caracterizado porque
  - 5 a) se elimina la biomasa del caldo de fermentación, en caso dado después de tratamiento con ácido fosfórico, mediante filtración o centrifugación, se aíslan los compuestos esteroides del filtrado con una cetona o un éster alifático de un alcohol alifático, se eliminan selectivamente las impurezas de tipo no esteroide de la fase orgánica mediante tratamiento con una solución acuosa de carácter básico y se obtiene el producto cristalino crudo que contiene los esteroides hidroxilados mediante adición de agua y evaporación del disolvente, y
  - 10 b) se disuelven los compuestos esteroides de la superficie de la biomasa filtrada obtenida en la etapa a) mediante tratamiento con cetonas o alcoholes alifáticos de 1 a 4 carbonos o con una solución acuosa de los mismos y se obtiene el producto cristalino crudo que contiene los esteroides hidroxilados después de evaporación del disolvente, luego
  - 15 c) se disuelve el producto obtenido en la etapa a) o en caso dado la mezcla de los dos productos crudos obtenidos en las etapas a) y b) en una cetona o un alcohol alifático de 1 a 4 carbonos miscible en agua o una solución acuosa de los mismos, se decolora la solución y se aíslan los cristales crudos homogéneos purificados después de la evaporación del disolvente, y
  - 20 d) se recristalizan los cristales crudos homogéneos purificados obtenidos en la etapa c) a partir de una mezcla hidrocarburo clorado/hidrocarburo alifático o cicloalifático y se aísla el producto puro.
2. Proceso según la reivindicación 1, caracterizado porque se utiliza acetato de etilo, acetato de n-propilo o isobutil metil cetona como cetona o éster alifático de un alcohol alifático.
3. Proceso según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque se ajusta la basicidad y la fuerza iónica de la solución acuosa utilizada para eliminar las impurezas no esteroides mediante la adición de hidróxidos de metales alcalinos o alcalinotérreos y/o sales básicas de los mismos, tales como carbonatos, bicarbonatos, fosfatos, hidrogenofosfatos, acetatos.

25